فصل چهاردهم
بیوکالریمتری[1]

۱۴-۱. تئوری بیوکالریمتری:

گرما یکی از مهمترین کمیت‌های فیزیکی در زیست‌شناسی است. سیستم‌ها و فرآیندهای بیولوژیک شدیدا نسبت به حرارت حساسند و این سیستم‌ها تنها در محدوده‌های گرمایی نسبتا باریکی عمل می‌نمایند. این محدوده‌ها توسط دو فاکتور تعیین می‌شوند:

۱- اثر دما بر فرآیندهای شیمیایی.
این اثر به وسیله معادله آرینیوس توصیف می‌شود:

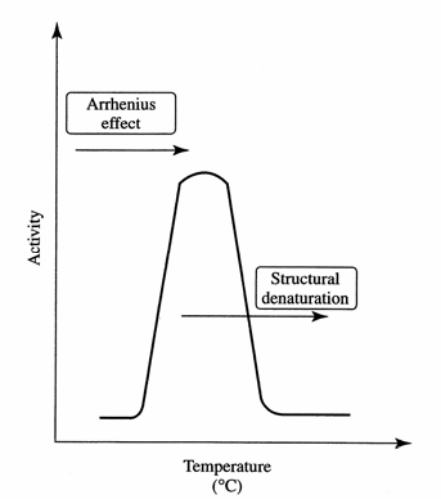
$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \qquad (۱-۱۴)$$

که در آن k ثابت سرعت، E_a انرژی فعال‌سازی، R ثابت جهانی گازها، T دمای مطلق و A ثابتی است که فاکتور فرکانس نامیده می‌شود و نشان‌دهنده تعداد کل برخوردهای مولکول‌های واکنشگر در واحد زمان با جهت‌یابی صحیح است که منجر به تولید محصول می‌شود. معادله آرینیوس نشان می‌دهد که سرعت واکنش‌های شیمیایی با افزایش دما به طور نمایی افزایش می‌یابد.

۲- حساسیت ساختمان پلی‌مرهای بیولوژیک در برابر تخریب گرمایی.
به عنوان مثال، گرما موجب غیرطبیعی‌شدن پروتئین‌ها و DNA می‌شود. نمونه خوبی از اثر این دو فاکتور، در واکنش‌های کاتالیزشده آنزیمی است که با افزایش دما سرعت واکنش آنزیمی افزایش می‌یابد و در دماهای بالاتر، سرعت واکنش به واسطه از دست رفتن ساختمان آنزیم کاهش می‌یابد (شکل ۱۴-۱):

---

[1] Biocalorimetry



شکل (۱۴-۱): اثر دما بر یک واکنش کاتالیز شده آنزیمی. دما سرعت واکنش های شیمیایی و از جمله واکنش‌های آنزیمی را افزایش می‌دهد. غیرطبیعی‌شدن ساختمان آنزیم نیز با افزایش دما افزایش می‌یابد که منجر به غیرفعال شدن آن می‌گردد. نمودار فعالیت آنزیمی در مقابل دما نتیجه این دو فرآیند متضاد است.

گرما همچنین به درک ما از جاری‌شدن انرژی در واکنش‌های شیمیایی کمک می‌نماید. قانون اول ترمودینامیک بیان می کند که انرژی نه بوجود می آید و نه از بین می‌رود بلکه تنها در حین یک واکنش شیمیایی تغییر شکل می‌دهد. بر اساس این قانون، می‌توان گرمای مصرف‌شده و یا تولیدشده در حین فرآیندهای شیمیایی را به طور مستقیم اندازه‌گیری نمود. وسیله‌ای که به این منظور مورد استفاده قرار می گیرد، کالریمتر نامیده می‌شود. روش معمول این است که با وارد و یا خارج نمودن حرارت، واکنش در دمای معینی ثابت نگاه داشته شود و مقدار گرمای مورد نیاز که باید افزوده شده و یا کسر گردد، به طور اتوماتیک اندازه گیری می شود. اندازه گیری های کالریمتری واکنش های بیوشیمیایی از قبیل اتصال پروتئین–DNA، تشکیل کمپلکس پروتئین–پروتئین و بازشدگی پروتئین، بیوکالریمتری نامیده می‌شود.

۱۴-۲. انرژی فعال‌سازی واکنش‌ها:

در یک واکنش شیمیایی، پیوندها شکسته و یا تشکیل می‌شوند. برای شکسته‌شدن پیوندها انرژی باید داده شود و در تشکیل پیوندها، انرژی آزاد می‌گردد. به عنوان مثال، در هنگام تشکیل پیوند پپتیدی بین دو اسید آمینه گلایسین؛

$$\begin{array}{c} NH_2-CH_2-COOH+NH_2-CH_2-COOH \\ \downarrow \\ NH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-COOH+H_2O \end{array} \qquad (۲-۱۴)$$

پیوند C–OH یک اسید آمینه و پیوند N–H اسید آمینه دیگر بایستی شکسته شود و یک پیوند پپتیدی CO–NH تشکیل شود. اگر فرآیند شکسته شدن پیوندها به انرژی کمتری از فرآیند تشکیل پیوند نیاز داشته باشد آنگاه واکنش، را اگزوترمیک[۲] می‌نامند. در حالت عکس، واکنش اندوترمیک[۳] نامیده می‌شود.

تئوری برخورد واکنش های شیمیایی، جمعیتی از واکنشگرها با دامنه وسیعی از مقادیر انرژی شیمیایی را در نظر می‌گیرد. واکنش تنها وقتی بین واکنشگرها روی می‌دهد که آنها با یکدیگر برخورد نموده و بتوانند در شکست و یا تشکیل پیوند شرکت کرده و به محصول تبدیل شوند. تنها مولکول‌هایی که انرژی شان از انرژی فعال سازی (E_a) بزرگتر باشد می توانند با یکدیگر واکنش دهند. انرژی فعال‌سازی سد موثری را در مقابل انجام واکنش بوجود می‌آورد که سد انرژی پتانسیل نامیده می‌شود و تنها بخشی از مولکول های واکنشگر قادر به غلبه بر این سد انرژی پتانسیل می باشند. تعداد مولکول‌های با انرژی بیشتر از انرژی فعال‌سازی از توزیع بولتزمن تبعیت می‌کنند:

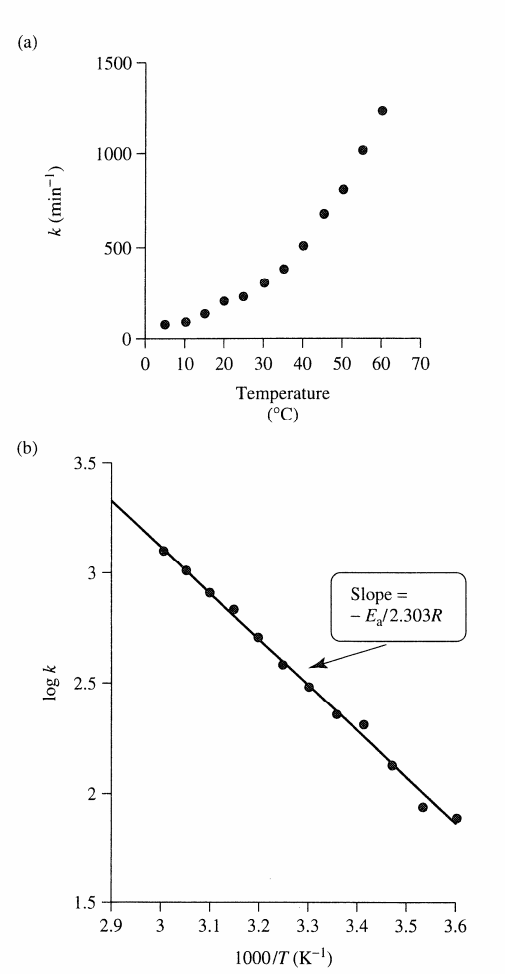
$$n = n_\circ e^{-\frac{E_a}{RT}} \qquad (۳-۱۴)$$

که در آن $n_\circ$ تعداد کل مولکول ها در جمعیت و n تعداد مولکول های با انرژی بیشتر از انرژی فعال‌سازی است. اگر بتوانیم ثابت سرعت را در دماهای مختلف اندازه‌گیری کنیم، آنگاه قادر خواهیم

---

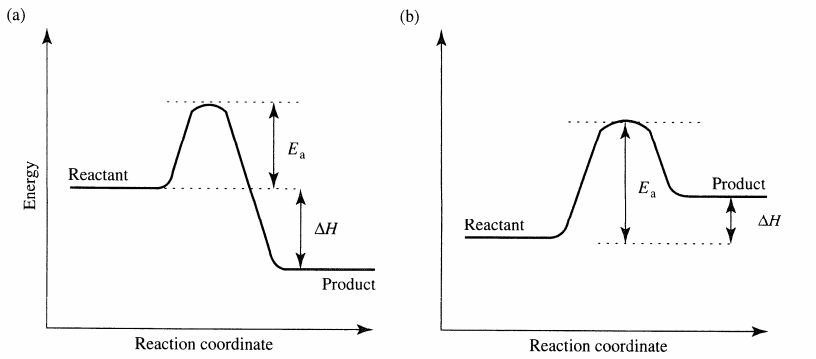
[۲] Exothermic
[۳] Endothermic

بود با استفاده از معادله آرینیوس، E_a را از نمودار $\log k$ در مقابل $1/T$ بدست آوریم (شکل ۱۴-۲) زیرا شیب چنین نموداری معادل $-E_a/2/303\,R$ خواهد بود:



شکل (۱۴-۲): نمودار آرینیوس یک واکنش شیمیایی. (a) واکنش‌های شیمیایی به طور نمایی به دما وابسته‌اند. (b) انرژی فعال سازی (E_a) را می‌توان از شیب نمودار آرینیوس محاسبه نمود.

ارتباط بین انرژی واکنشگرها و E_a در شکل (۱۴-۳) نشان داده شده است:



شکل (۱۴-۳): دیاگرام‌های انرژی پتانسیل واکنش‌ها. (a) یک واکنش اگزوترمیک منجر به آزاد شدن انتالپی می‌شود. (b) یک واکنش اندوترمیک همراه با جذب انتالپی است. E_a انرژی فعال‌سازی و ΔH انتالپی واکنش است.

واکنش های اگزوترمیک گرما آزاد می کنند در حالی که واکنش های اندوترمیک همراه با جذب گرما می باشند. گونه پرانرژی و ناپایدار تشکیل شده در مسیر واکنش، حالت گذار[۴] نامیده می شود. برخی از واکنش ها ممکن است دارای چندین سد انرژی فعال سازی باشند و در مسیر چنین واکنش‌هایی چندین حالت گذار وجود داشته باشد. در چنین مواردی مرحله‌ای که بزرگترین سد انرژی فعال‌سازی را دارد، کندترین مرحله واکنش بوده و این مرحله، مرحله تعیین‌کننده سرعت کل واکنش محسوب می‌شود.

۱۴-۳. انتالپی:

انرژی تولیدشده یا جذب‌شده در حین یک واکنش تغییر در انتالپی (ΔH) واکنش نامیده می‌شود. در واکنش های اندوترمیک، مقدار انتالپی (H) محصول بزرگتر از مقدار انتالپی واکنش گرهاست در حالی که در واکنش‌های اگزوترمیک حالت عکس صادق است. انتالپی به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$H = U + pV \qquad (۴-۱۴)$$

[۴] Transition State

که در آن U انرژی درونی و V حجم در فشار p است. در یک واکنش شیمیایی که در یک سیستم ترمودینامیکی بسته (که تنها توانایی انجام کار فشار- حجم را دارد)، تغییر در انرژی درونی (ΔU) از رابطه زیر بدست می‌آید:

$$\Delta U = q - \int pdV \qquad (۵-۱۴)$$

که در آن q گرمایی است که بین سیستم و محیط مبادله می شود.

تغییر انتالپی (ΔH) به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$\Delta H = \Delta U + \int pdV + \int Vdp \qquad (۶-۱۴)$$

که در آن dV و dp به ترتیب تغییر حجم و فشار در حین واکنش است. با ادغام دو معادله (۱۴-۵) و (۱۴-۶) خواهیم داشت:

$$\Delta H = q + \int Vdp \qquad (۷-۱۴)$$

بنابراین، در فشار ثابت ($dp = ۰$) برای سیستمی بسته که تنها کار فشار- حجم انجام می‌دهد، خواهیم داشت:

$$\Delta H = q \qquad (۸-۱۴)$$

از اینرو، در فشار ثابت، مقادیر (ΔH) را می توان در یک کالریمتر ایزوبار (فشار ثابت) به وسیله اندازه‌گیری مستقیم q (گرمای آزادشده و یا جذب‌شده) تعیین نمود.

انتالپی خاصیت ذاتی هر مولکول در شرایط معین دما، فشار و فاز است. تغییر فاز از جامد به مایع و از مایع به گاز منجر به مقادیر انتالپی ذاتی متفاوتی برای یک مولکول معین می‌شود. استاندارد نمودن و مقایسه مقادیر انتالپی از طریق گزارش داده‌ها به صورت انتالپی استاندارد واکنش (ΔH°) صورت می‌گیرد. انتالپی استاندارد واکنش به صورت تغییر انتالپی روی داده وقتی که واکنش‌گرها در غلظت ۱ M در ۲۵ $^\circ$C و در فشار یک اتمسفر با هم واکنش می‌دهند، تعریف می‌شود.

۱۴-۴. انتروپی:

انتروپی (S) نیز یک کمیت ترمودینامیکی ذاتی تمامی مولکول‌هاست. قانون دوم ترمودینامیک بیان می‌کند که یک سیستم منزوی که در تعادل ترمودینامیکی نیست متحمل تغییر خودبخود می‌شود به نحوی که انتروپی‌اش افزایش یابد. این قانون به ویژه در ارتباط با ماکرومولکول‌های بیولوژیک و به طور کلی سیستم‌های بیولوژیک است زیرا این سیستم‌ها دارای ساختمان‌های غیرمعمول منظمی می‌باشند و تمایل طبیعی به پذیرفتن شکل‌های منظم بیشتری دارند.

یک جامد کریستالی کامل که هیچ حرکت ارتعاشی نداشته باشد دارای انتروپی صفر است. با افزایش دما، سطح انتروپی نیز افزایش می‌یابد. تبدیل جامد به مایع منجر به تغییر انتروپی بزرگی می‌شود و همچنین تبدیل مایع به گاز نیز با افزایش انتروپی باز هم بیشتری همراه است. هر فرآیندی که منجر به افزایش بی‌نظمی شود، مثل حل‌شدن یک جامد در یک حلال مایع، افزایش تعداد مولکول‌ها در یک واکنش شیمیایی یا بازشدن پروتئین، موجب افزایش انتروپی می‌گردد.

بر طبق قانون دوم ترمودینامیک، تغیر انتروپی (ΔS) به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$\Delta S = \int \frac{dq_{rev}}{T} \qquad (۹-۱۴)$$

که در آن q_{rev}، گرمای برگشت‌پذیری است که بین سیستم و محیط مبادله می‌شود. در یک فرآیند همدما[۵] (فرآیندی که در طول آن دما ثابت باشد)، $\Delta S = q_{rev}/T$ می‌باشد.

پیامد قانون دوم ترمودینامیک این است که ΔS_{Total} (که از مجموع ΔS_{System} و $\Delta S_{\text{Surronding}}$ بدست می‌آید) بزرگتر از صفر باشد. یعنی:

$$\Delta S_{\text{Total}} = \Delta S_{\text{System}} + \Delta S_{Surronding} \rangle ۰ \qquad (۱۰-۱۴)$$

اگر واکنش اگزوترمیک باشد، سیستم به محیط اطرافش گرما می‌دهد. اگر محیط به اندازه کافی بزرگ باشد که گرمای جذب شده توسط محیط از سیستم موجب افزایش دمایش نشود (که در مورد سلول‌های زنده معمولا چنین است)، آنگاه در فشار ثابت می‌توان نوشت:

---

[۵] Isothermal

$$\Delta S_{\text{System}} - \frac{\Delta H_{\text{System}}}{T} \rangle \cdot \qquad (۱۱-۱۴)$$

یا

$$T\Delta S_{\text{System}} - \Delta H_{\text{System}} \rangle \cdot \qquad (۱۲-۱۴)$$

بنابراین واکنش های خود بخود عموما وقتی انجام می شوند که $\Delta H_{\text{System}} \langle T\Delta S_{\text{System}}$ باشد. واکنش های اندوترمیک با مقادیر ΔS_{System} به اندازه کافی بزرگ موجب می شوند که $T\Delta S_{\text{System}}$ بزرگتر از ΔH_{System} شود و این واکنش‌ها در دماهای بالا به طور خودبخود انجام شوند.

۱۴-۵. انرژی آزاد:

همانطور که تمامی مولکول‌ها دارای مقادیر انتالپی و انتروپی ذاتی در شرایط معین دما، فشار و فاز می‌باشند، همچنین همه مولکول‌ها دارای مقادیر متفاوتی از نوع خاصی از انرژی می‌باشند که به صورت انرژی دردسترس برای انجام کار توصیف می‌شود. این انرژی، به افتخار ویلارد گیبس[۶]، انرژی آزاد گیبس (G) نامیده می‌شود. واکنش‌های شیمیایی خودبخود همیشه همراه با کاهش در G می‌باشند. به عبارت دیگر، ΔG آنها منفی است. چنین واکنش هایی را اگزرگونیک[۷] می نامند. واکنش های غیرخودبخود دارای ΔG مثبت هستند و اندرگونیک[۸] نامیده می‌شوند. برای یک واکنش خودبخود، با توجه به تعریف ΔG و معادله (۱۴-۱۲) می‌توان نوشت:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \langle \cdot \qquad (۱۳-۱۴)$$

این معادله نشان دهنده این حقیقت است که تنها بخشی از انرژی آزاد واقعا برای انجام کار در دسترس می‌باشد زیرا بخشی از آن در تغییرات انتروپی مستهلک می‌شود.

---

[۶] Willard Gibbs
[۷] Exergonic
[۸] Endergonic

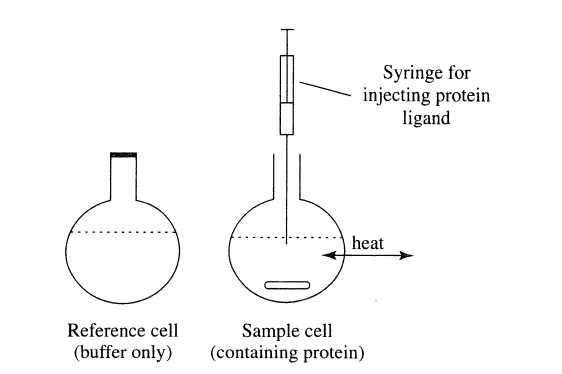
۱۴-۶. کالریمتری تیتراسیون همدما[۹]:

با استفاده از بیوکالریمتری می‌توان به طور مستقیم تغییرات انتالپی را در حین واکنش‌های شیمیایی و فرآیندها اندازه‌گیری نمود. دو نوع عمده کالریمتری که امروزه به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از:

کالریمتری تیتراسیون همدما (ITC) و کالریمتری اسکن تفاضلی[۱۰] (DSC).

ITC ممکن است به طور مستقیم برای اندازه‌گیری تغییرات ΔH فرآیندهایی از قبیل اتصال لیگاند و تشکیل کمپلکس مورد استفاده قرار گیرد. DSC برای مطالعه تغییرات فاز آغاز شده توسط گرما در بیوپلی مرها و همچنین اندازه گیری مقادیر ΔH و دیگر پارامترهای ترمودینامیکی فرآیندها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شمای اجمالی یک دستگاه ITC در شکل (۱۴-۴) نشان داه شده است:

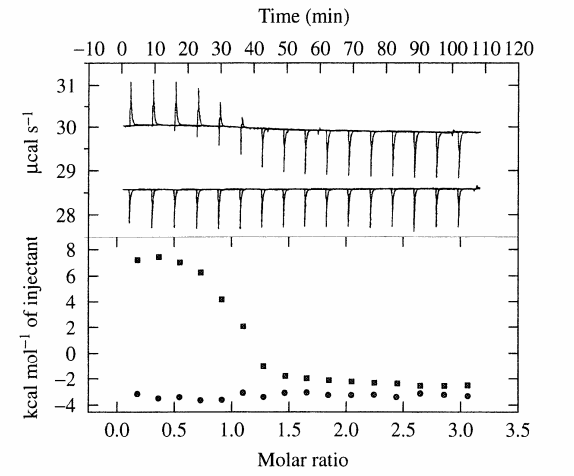


شکل (۱۴-۴): شمای یک دستگاه کالریمتر تیتراسیون همدما. افزودن ماده‌ای مثل یک لیگاند به یک پروتئین در سل نمونه موجب آزادشدن و یا جذب مقدار کمی گرما می‌شود. در حین یک آزمایش، چندین بار چنین تزریقی صورت گرفته و گرمای آزاد و یا جذب‌شده به طور الکترونیکی اندازه‌گیری و آنالیز می‌شود.

[۹] Isothermal Titration Calorimetry
[۱۰] Differential Scanning Calorimetry

این سیستم در محدوده غلظتی میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین‌ها عمل می‌کند. در یک آزمایش ITC، گرمای آزاد شده و یا جذب شده به صورت تابعی از مقادیر کم معرف افزوده‌شده به سل کالریمتر اندازه‌گیری می‌شود. دستگاه دارای یک سل مرجع و یک سل نمونه می‌باشد. سل مرجع فقط حاوی بافر است در حالی که سل نمونه دارای پروتئین و بافر است. معرف افزوده‌شده به سل نمونه می‌تواند لیگاند یک پروتئین و یا سوبسترا یا مهارکننده یک آنزیم باشد. افزایش معرف در حجم‌های یکسان[۱۱] کوچک انجام می‌شود و در ابتدای آزمایش، پروتئین در مقادیر اضافی نسبت به لیگاند وجود دارد.

این بدین معنی است که مقادیر ΔH حاصل از افزایش هر حجم یکسان معرف می‌تواند به طور انفرادی اندازه‌گیری شود. در تزریق‌های اولیه، ΔH هر تزریق مقدار بزرگی است ولی با تزریق‌های بعدی مقادیر ΔH کاهش یافته و شبیه به ΔH رقیق‌شدن لیگاند در محلول موجود در سل کالریمتر خواهد شد (شکل ۱۴-۵):



شکل(۱۴-۵): در یک آزمایش ITC، حجم‌های کوچک یکسان از دارویی که قابلیت میان‌کنش با DNA را دارد به طور متناوب به درون سل ITC که حاوی DNA می‌باشد تزریق شده و گرمای حاصله از هر تزریق اندازه‌گیری می‌گردد (بخش بالایی). پس از کسر نمودن گرمای محلول برای هر تزریق (خطوط معکوس در بخش بالایی)، ایزوترم اتصالی برای چنین فرآیندی بدست می‌آید (نقاط مربعی شکل در بخش پایینی).

[۱۱] Aliquots

ΔH اندازه‌گیری‌شده، تغییر انتالپی کل است که شامل گرمای فرآیندهایی از قبیل تشکیل پیوندهای غیرکووالان بین مولکول‌های میان‌کنش کننده و دیگر تعادلات موجود در سیستم از قبیل تغییرات بنای فضایی، یونیزاسیون گروه‌های یونیزه شونده و تغییرات ناشی از میان‌کنش با حلال می‌باشد.

نتایج حاصل از یک آزمایش ITC غالبا به صورت انتالپی ظاهری گزارش می‌شود و با دیگر آزمایش‌هایی که در شرایط یکسان انجام شده‌اند (مثلا داده‌های DSC) مورد مقایسه قرار می‌گیرد. با چنین مقایسه‌ای می‌توان سهم اثرات اتصالی را به طور صحیح از اثرات بنای‌فضایی و اثرات حلال تمیز داد.

۱۴-۷. مثال‌هایی از کاربردهای ITC

۱۴-۷-۱. استفاده از ITC در آزمایش‌های اتصالی:

ITC ابزار مفیدی را برای مطالعه فرآیندهای اتصالی که در آنها پروتئین (P) به لیگاند (L) متصل می‌شود فراهم می‌کند:

$$\mathrm{P} + \mathrm{L} \leftrightarrow \mathrm{PL} \qquad (۱۴-۱۴)$$

با استفاده از ITC می‌توان ثابت اتصال (K_a) و ثابت تفکیک (K_d) را بدست آورد:

$$K_a = \frac{[\mathrm{PL}]}{[\mathrm{P}]\,[\mathrm{L}]} \qquad (۱۴-۱۵)$$

و

$$K_d = \frac{[\mathrm{P}]\,[\mathrm{L}]}{[\mathrm{PL}]} \qquad (۱۴-۱۶)$$

K_d توسط معادله زیر به ΔG مرتبط می‌شود:

$$\Delta G = -RT \ln K_d \qquad (۱۴-۱۷)$$

از آنجایی که ΔH اتصالی با نزدیک شدن سیستم به حالت تعادل کاهش می‌یابد، ITC ابزار مناسبی برای مطالعه میان کنش‌های اتصالی است. با کسر کردن گرماهایی مثل گرمای رقیق شدن می‌توان ایزوترم اتصالی را بدست آورد و با استفاده از آن K_d یا K_a را محاسبه نمود.

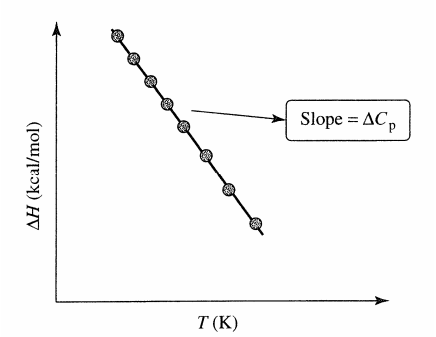
۱۴-۷-۲. تعیین تغییر ظرفیت گرمایی به وسیله ITC:

ظرفیت گرمایی یا گرمای ویژه یک ماده معیاری از توانایی آن ماده برای جذب گرماست. ظرفیت گرمایی در فشار ثابت را به صورت C_p نمایش می‌دهند و عبارت است مقدار گرمایی که در فشار ثابت، دمای ۱g ماده را به اندازه $1^\circ C$ افزایش می دهد. به عنوان مثال، گرمای ویژه آب $1\ cal/g\ ^\circ C$ است در حالی که گرمای ویژه اتانول $0/58\ cal/g\ ^\circ C$ می‌باشد. تفاوت گرماهای ویژه این دو ماده به این معنی است که اگر وزن‌های یکسانی از آب و اتانول مقدار انرژی گرمایی یکسانی را جذب کنند، دمای اتانول بیشتر از آب افزایش می یابد. برای بیشتر واکنش‌هایی که با شرکت مولکول‌هایی با جرم مولکولی پایین می‌باشند، مقادیر C_p واکنش‌گرها و محصولات با هم اختلاف قابل توجهی ندارد. در حالی که در مورد فرآیندهایی که با شرکت مولکول‌های بزرگی مثل پروتئین‌هاست، تغییر در C_p می‌تواند بزرگ باشد. آب اتصال یافته به سطح چنین بیوپلی‌مرهایی رفتار متفاوتی از آب توده دارد. در فرآیندهایی مثل بازشدن پروتئین‌ها که در حین آن نواحی آب‌گریز درونی پروتئین در معرض تماس با آب قرار می‌گیرد، تغییر در C_p می‌تواند بزرگتر نیز باشد. ساختمان پروتئین‌ها توسط میان کنش‌های آب‌گریز درونی نسبتا صلب نگاه داشته می‌شود. وقتی دما افزایش می‌یابد، صلبیت ساختمانی پروتئین به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یابد که منجر به افزایش زیاد C_p حالت غیرطبیعی شده نسبت به C_p حالت طبیعی می‌شود. در حین فرآیندهایی از قبیل تشکیل کمپلکس بین پروتئین و لیگاند، بخش‌های قابل ملاحظه‌ای از سطح یک پروتئین ممکن است از تماس مستقیم با آب دور نگاه داشته شده که منجر به اثر معکوس و کاهش زیاد C_p می‌گردد. در واقع ارتباط مستقیمی بین ΔC_p و مساحت سطحی از ساختمان پروتئین که در حین تشکیل کمپلکس از تماس با آب دور نگاه داشته می‌شود وجود دارد.

از آنجایی که دستگاه‌های ITC معمولا در محدوده $0-60^\circ C$ کار می‌کنند، می‌توان از ITC برای تعیین تغییرات ظرفیت گرمایی با افزایش دما استفاده نمود. تغییر در C_p، انتالپی و انتروپی در دماهای متفاوت T_1 و T_2 توسط معادله زیر داده می‌شود:

$$\Delta C_{\mathrm{p}} = \frac{\Delta H_{T_2} - \Delta H_{T_1}}{T_2 - T_1} = \frac{\Delta S_{T_2} - \Delta S_{T_1}}{\ln\left(T_2 / T_1\right)} \qquad (۱۸-۱۴)$$

رسم نمودار تغییرات ΔH در مقابل دما خط راستی را تولید می‌کند که شیب آن معادل $-\Delta C_{\mathrm{p}}$ است (شکل ۱۴-۶):



شکل (۱۴-۶): تعیین گرمای ویژه با استفاده از داده‌های انتالپی. نمودار تغییرات ΔC_{p} در مقابل T خط راستی با شیب $-\Delta C_{\mathrm{p}}$ می‌باشد.

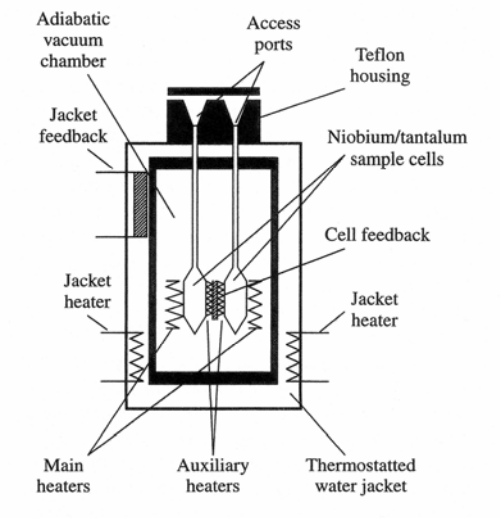
اندازه‌گیری ΔC_{p} توسط ITC این امکان را فراهم می‌کند که بتوان تغییرات ساختمانی در بیوپلی‌مرها را در حین فرآیندهایی از قبیل تشکیل کمپلکس، تاخوردگی پروتئین و تشکیل مارپیچ مضاعف DNA مورد تعقیب قرار داد.

۱۴-۸. کالریمتری اسکن تفاضلی:

DSC دومین نوع عمده تکنیک بیوکالریمتری است که تغییرات C_{p} را به صورت تابعی از تغییر دما اندازه‌گیری می‌نماید. این تکنیک به ویژه در تعیین پارامترهای ترمودینامیکی فرآیندهایی که با افزایش یا کاهش دما شروع می‌شوند مفید است. اثرات شرایط آزمایشی مختلف از قبیل pH، قدرت یونی، نوع حلال و حضور یا غیاب لیگاند را می‌توان به وسیله DSC بر روی پارامترهای ترمودینامیکی مورد مطالعه قرار داد. این تکنیک به ویژه نسبت به تغییرات فاز در بیو پلی مرها که ناشی از پدیده‌هایی از قبیل اتصال پروتئین، باز شدگی پروتئین و اتصال لیگاند باشد بسیار حساس است. از

آنجایی که معمولا مقادیر بسیار کوچک ΔC_p اندازه‌گیری می‌شوند، مقایسه محلول نمونه با یک محلول مرجع که تنها حاوی بافر باشد ضروری است. به علاوه، برای بدست آوردن داده‌های کافی برای تعیین صحیح C_p بایستی اسکن‌های مکرر انجام داد.

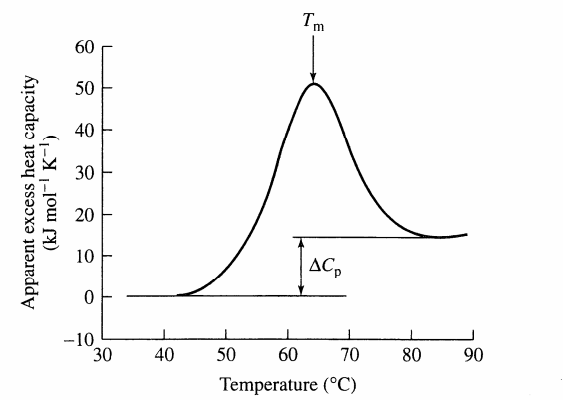
در سل مرجع، بافر و در سل نمونه دستگاه DSC، محلول پروتئین در بافر به غلظت ۵-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قرار داده می‌شود. این دو محلول به طور الکتریکی گرم می‌شوند. چون پروتئین در اثر گرم شدن غیرطبیعی می‌شود، گرمای بیشتری نسبت به سل مرجع دریافت می‌کند (غیرطبیعی شدن حرارتی پروتئین‌ها اندوترمیک است) و جریان الکتریکی بیشتری برای گرم کردن سل نمونه ثبت می‌شود. هر دو سل پس از گرم شدن[۱۲]، سرد می‌شوند[۱۳] و این عمل چندین بار تکرار می‌شود. این اسکن‌های مکرر جمع زده شده و انتالپی فرآیندهایی از قبیل بازشدگی پروتئین، اتصال لیگاند و یا تشکیل کمپلکس به طور صحیح اندازه‌گیری می‌شود. شمای کلی یک دستگاه DSC در شکل (۱۴-۷) نشان داده شده است:



شکل (۱۴–۷): شمای کلی یک کالریمتر اسکن گرمایی.

[۱۲] Up Scan
[۱۳] Down Scan

بیشتر کالریمترهای DSC در محدوده $1-98\ ^{\circ}C$ کار می کنند و دستگاه های جدیدتر محدوده گرمایی گسترده‌تری دارند. معمولا یک آزمایش DSC را در محدوده بزرگی از غلظت ماکرومولکول، سرعت اسکن (K/h) و شرایط متنوع آزمایشی از قبیل pH، قدرت یونی و غیره انجام می‌دهند. به عنوان نمونه، یک سیگنال DSC که پس از کسر کردن سیگنال پایه[۱۴] بدست آمده در شکل (۱۴-۸) نشان داده شده است:

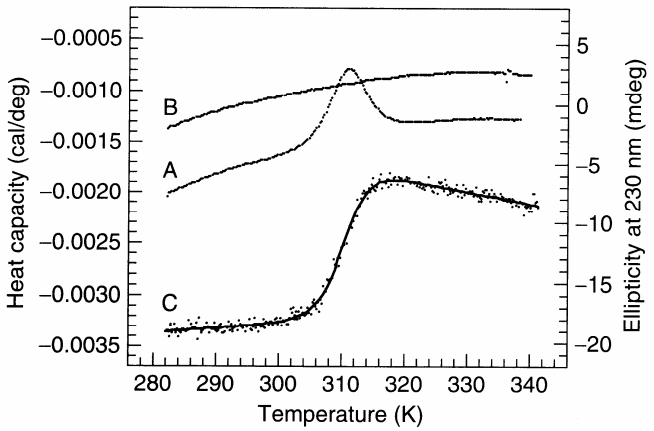


شکل (۱۴-۸): کالریمتری اسکن گرمایی یوبی‌کوئیتین در یک آزمایش غیرطبیعی‌شدن گرمایی. دمای ذوب پروتئین (T_m) از نوک پیک DSC بدست می‌آید در حالی که تغییر در C_p (ΔC_p) از تفاضل C_p حالت طبیعی و غیرطبیعی‌شده پروتئین محاسبه می‌شود.

سطح زیر منحنی، نشان دهنده انتالپی فرآیند غیرطبیعی شدن گرمایی و T_m و ΔC_p نیز از دیگر اطلاعات بدست آمده از سیگنال DSC است. به طور ایده‌آل، این پارامترهای ترمودینامیکی نبایستی وابستگی به سرعت اسکن و یا غلظت نمونه داشته باشند. از آنجایی که تنها فرآیندهای مربوط به مولکول‌های بزرگ دارای مقادیر ΔC_p قابل اندازه‌گیری می‌باشد، DSC تکنیک مناسبی برای مطالعه فرآیندهای مربوط به چنین مولکول‌هایی است و این نکته وجه مهم اختلاف این تکنیک و ITC است.

[۱۴] Baseline

اطلاعات حاصل از DSC توسط روش‌های اسکپتروسکوپی مستقل مثل CD می‌تواند تکمیل و تایید شود. در شکل (۱۴–۹) تطابق اطلاعات حاصل از DSC و CD در مورد آنزیم رایبونوکلئاز نشان داده شده است:



شکل (۱۴–۹): برای بدست آوردن نمودار نهایی DSC رایبونوکلئاز، سیگنال پایه (B) بایستی از سیگنال غیرطبیعی‌شدن گرمایی آنزیم (A) کسر گردد. نمودار CD (C) تایید می‌کند که T_m آنزیم در نوک سیگنال DSC واقع شده است.

۱۴-۹. تعیین پارامترهای ترمودینامیکی توسط روش‌های غیرکالریمتری و مقایسه آن با روش کالریمتری:

برای هر فرآیند شیمیایی، ثابت تعادل (K_a) از نسبت غلظت محصولات به واکنش‌گرها بدست می‌آید. به عنوان مثال، با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی مانند فلوئورسانس می‌توان کسری از پروتئین که در حالت بازشده وجود دارد را اندازه‌گیری نمود. این مقادیر توسط معادله وانت هوف[۱۵] به تغییر انتالپی واکنش مرتبط می‌شوند:

$$\frac{\mathrm{d}\ln K_a}{\mathrm{d}T} = \frac{\Delta H}{RT^2} \qquad (۱۹-۱۴)$$

[۱۵] van't Hoff

از اینرو با استفاده از معادله وانت هوف می‌توان به روش غیرکالریمتری ΔH واکنش را تعیین نمود. انتالپی بدست آمده، انتالپی وانت هوفی نامیده می‌شود که آن را با ΔH_{vh} نشان می‌دهند. مقایسه انتالپی کالریمتری $(\Delta H_{\mathrm{cal}})$ و انتالپی وانت هوفی (ΔH_{vh}) می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد ماهیت یک انتقال به عنوان مثال از حالت طبیعی (N) به حالت غیرطبیعی‌شده (D) پروتئین بدست دهد. اگر انتقال از حالت N به حالت D پروتئین در یک مرحله منفرد صورت گیرد، این انتقال دو حالتی[۱۶] محسوب می‌شود در حالی که اگر گونه‌های حدواسط حالات N و D نیز در انتقال حضور داشته باشند، انتقال چند حالتی[۱۷] به شمار می‌آید.

۱۴-۱۰. تست انتالپی برای یک انتقال دو حالتی:

اندازه‌گیری‌های کالریمتری به خودی خود می‌توانند حضور حدواسط‌ها را در حین انتقال تشخیص دهند. در موارد زیادی دو یا چند فاز در ترموگرام‌ها مشاهده شده که نشان دهنده حضور حدواسط‌هاست. در عین حال، مواردی وجود دارند که در آنها تنها یک انتقال مشاهده می‌شود در حالی که حدواسط یا حدواسط‌هایی نیز امکان حضور دارند. ΔH_{cal}، تغییر انتالپی کل را، صرف‌نظر از اینکه فرآیند دو و یا چند حالتی است، اندازه‌گیری می‌کند. برای یک انتقال دو حالتی، ΔH_{vh} معادل ΔH_{cal} است. از اینرو، نسبت $\Delta H_{vh} / \Delta H_{cal}$ یک روش مناسب برای تایید وجود مکانیزم دو حالتی است بدین معنی که اگر این نسبت معادل ۱ باشد، هیچ حدواسطی حضور ندارد. نسبت کوچکتر از ۱ نشان دهنده حضور حدواسط است. در برخی موارد نیز این نسبت می‌تواند بزرگتر از ۱ باشد که نشان‌دهنده وقوع تجمع در سیستم است.

۱۴-۱۰-۱. مثال- کالریمتری اسکن تفاضلی در مطالعه بازشدگی پروتئین:

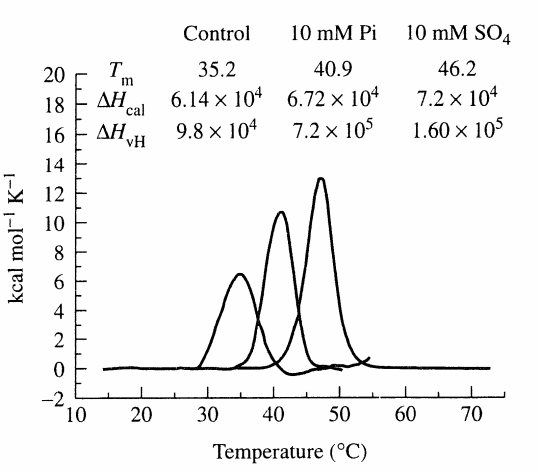
فاکتورهای رشد فیبروبلاست[۱۸] (FGFs) سایتوکین‌هایی می‌باشند که موجب تقسیم بسیاری از سلول‌ها می‌شوند. این اثر ناشی از اتصال این فاکتورها به گیرنده‌های سلولی است.

فاکتور رشد فیبروبلاست اسیدی (aFGF) به چهار نوع گیرنده سلولی سلول‌های مایوبلاست، اندوتلیال، کوندروسیت و فیبروبلاست متصل می‌شود. اتصال این پروتئین به هپارین موجب پایداری بیشتر آن

[۱۶] Two-State
[۱۷] Multi-State
[۱۸] Fibroblast Growth Factors

در برابر دما و pH بالا و همچنین تجزیه آن توسط پروتئولیز و اکسیداسیون می‌شود. در غیاب هپارین، T_m پروتئین نزدیک به دمای فیزیولوژیک است و حضور هپارین و اتصال آن به پروتئین موجب افزایش T_m آن به اندازه $20\,^{\circ}C$ می‌شود. فاکتورهای رشد فیبروبلاست اسیدی دارای سه باقی‌مانده سیستئین می‌باشند و تشکیل پل دی‌سولفید در ساختمان آنها موجب غیرفعال شدن آنان در غیاب هپارین می‌شود. تیمار پروتئین توسط عوامل احیاءکننده باعث فعال‌شدن دوباره آن می‌گردد.

به منظور مطالعه بیشتر فرآیند بازشدگی این پروتئین، داده‌های کالریمتری آن توسط DSC بدست آمده است. همان طور که در شکل (۱۴-۱۰) نشان داده شده، افزودن یون‌های فسفات و سولفات موجب افزایش قابل توجهی در T_m پروتئین شده است:



شکل (۱۴-۱۰): ترموگرام کالریمتری اسکن تفاضلی aFGF در غیاب (شاهد) و حضور ۱۰ mM یون‌های فسفات و سولفات. مقادیر ΔH_{cal} ، ΔH_{vh} و T_m هر حالت نیز در شکل نشان داده شده است. توجه داشته باشید که ΔH تعیین شده توسط DSC (ΔH_{cal}) کوچکتر از ΔH_{vh} است.